

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-4894

(P2000-4894A)

(43)公開日 平成12年1月11日(2000.1.11)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード*(参考)
C 1 2 P 7/64		C 1 2 P 7/64	4 B 0 6 4
C 0 7 C 69/30		C 0 7 C 69/30	4 H 0 0 6
C 1 1 C 3/08		C 1 1 C 3/08	4 H 0 5 9
	3/10		3/10

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平10-172942  
(22)出願日 平成10年6月19日(1998.6.19)

(71)出願人 000001904  
サントリー株式会社  
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
(71)出願人 591030499  
大阪市  
大阪府大阪市北区中之島1-3-20  
(72)発明者 秋元 健吾  
大阪府三島郡島本町山崎5-2-5 サン  
トリー株式会社技術開発センター内  
(74)代理人 100077517  
弁理士 石田 敏 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トリグリセリドの製造方法

(57)【要約】

【課題】 ヒト母乳型のトリグリセリド構造と考えられている構造脂質、即ち、トリグリセリドの2位が炭素数が16～18の飽和脂肪酸であり、1及び3位に結合した不飽和脂肪酸の少なくともひとつが $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸である新規なトリグリセリドの製造方法の提供。

【解決手段】 2位に炭素数が16～18の飽和脂肪酸が結合しているグリセリドに、1、3位のエステル結合に特異的に作用するリパーゼを作用させ、エステル交換反応によって1及び3位の脂肪酸が $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び/又は $\omega$ 9系の不飽和脂肪酸となったトリグリセリドを製造するに際し、一旦トリグリセリドの2位の脂肪酸が炭素数が16～18の飽和脂肪酸であり、1及び3位の脂肪酸が中鎖脂肪酸となった融点が45℃以下のトリグリセリドを原料として用いるかまたはそれを中間体として経由させることによって、目的とするトリグリセリドを製造する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 トリグリセリドの 2 位の脂肪酸が炭素数 16～18 の飽和脂肪酸であり、1 及び 3 位の脂肪酸の少なくともひとつが  $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸であるトリグリセリドを製造する方法であって、トリグリセリドの 2 位の脂肪酸が炭素数 16～18 の飽和脂肪酸であり、1 及び 3 位の脂肪酸が中鎖脂肪酸である融点が 45℃以下のトリグリセリドに、 $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系不飽和脂肪酸又はそのエステルが存在下で、1、3 位特異的リパーゼを作用させてエステル交換反応によって目的のトリグリセリドを得ることを特徴とする当該トリグリセリドの製造方法。

【請求項 2】 製造するトリグリセリドが、トリグリセリドの 2 位の脂肪酸が炭素数 16～18 の飽和脂肪酸であり、1 及び 3 位の脂肪酸の一方が  $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸であり、他方も当該不飽和脂肪酸と同 \*

- 9, 12, 15-オクタデカトリエン酸 ( $\alpha$ -リノレン酸) 18:3, $\omega$ 3
- 6, 9, 12, 15- オクタデカテトラエン酸 (ステアリドン酸) 18:4, $\omega$ 3
- 11, 14, 17- エイコサトリエン酸 (ジホモ-  $\alpha$ - リノレン酸) 20:3, $\omega$ 3
- 8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸 20:4, $\omega$ 3
- 5, 8, 11, 14, 17- エイコサペンタエン酸 20:5, $\omega$ 3
- 7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸 22:5, $\omega$ 3
- 4, 7, 10, 13, 16, 19- ドコサヘキサエン酸 22:6, $\omega$ 3
- 9, 12-オクタデカジエン酸 (リノール酸) 18:2, $\omega$ 6
- 6, 9, 12- オクタデカトリエン酸 ( $\gamma$ - リノレン酸) 18:3, $\omega$ 6
- 8, 11, 14-エイコサトリエン酸 (ジホモ-  $\gamma$ - リノレン酸) 20:3, $\omega$ 6
- 5, 8, 11, 14- エイコサテトラエン酸 (アラキドン酸) 20:4, $\omega$ 6
- 7, 10, 13, 16-ドコサテトラエン酸 22:4, $\omega$ 6
- 4, 7, 10, 13, 16- ドコサペンタエン酸 22:5, $\omega$ 6
- 6, 9- オクタデカジエン酸 18:2, $\omega$ 9
- 8, 11-エイコサジエン酸 20:2, $\omega$ 9
- 5, 8, 11- エイコサトリエン酸 (ミード酸) 20:3, $\omega$ 9

からなる群から選ばれる不飽和脂肪酸である、請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載のトリグリセリドの製造方法。

【請求項 6】 エステル交換反応のために用いる 2 位に炭素数 16～18 の飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドが、 $\omega$  3、 $\omega$  6 及び／又は  $\omega$  9 系不飽和脂肪酸をトリグリセリドの構成脂肪酸として生産する能力を有する微生物由来であり、当該トリグリセリドの 2 位に炭素数 16～18 の飽和脂肪酸が結合し、1 及び 3 位に  $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸が結合しているトリグリセリドであることを特徴とする、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載のトリグリセリドの製造方法。

【請求項 7】 エステル交換反応のために添加する \*

\*  $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸である請求項 1 記載のトリグリセリドの製造方法。

【請求項 3】 製造するトリグリセリドが、トリグリセリドの 2 位の脂肪酸が炭素数 16～18 の飽和脂肪酸であり、1 及び 3 位の脂肪酸の一方が  $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸であり、他方が当該不飽和脂肪酸と異なる  $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸である請求項 1 記載のトリグリセリドの製造方法。

【請求項 4】 製造するトリグリセリドが、トリグリセリドの 2 位の脂肪酸が炭素数 16～18 の飽和脂肪酸であり、1 及び 3 位の脂肪酸の一方が  $\omega$  3、 $\omega$  6 又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸であり、他方が炭素数 4～18 の飽和脂肪酸である請求項 1 記載のトリグリセリドの製造方法。

【請求項 5】  $\omega$  3、 $\omega$  6 及び／又は  $\omega$  9 系の不飽和脂肪酸が、

【請求項 8】 トリグリセリドの 2 位の脂肪酸がパルミチン酸またはステアリン酸である請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載のトリグリセリドの製造方法。

【請求項 9】 有機溶媒を使用しない反応系でエステル交換反応を行うことを特徴とする、請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載のトリグリセリドの製造方法。

【請求項 10】 反応温度を 45℃以下でエステル交換反応を行うことを特徴とする、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載のトリグリセリドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新しいトリグリセリドの製造方法及び用いるもの、特にトリグリセリドの \*

脂肪であり、トリグリセリドの1, 2及び3位に種々の脂肪酸がエステル結合したトリグリセリドの混合物である。そして、脂肪酸の結合位置の違いにより、その生理活性が異なることが指摘されており、トリグリセリドの決まった位置に特定の脂肪酸を結合させた脂質（構造脂質）が、最近、特に注目されている。

【0003】例えば、特公平4-12920には、トリグリセリドの2位に炭素数8～14の脂肪酸が結合し、1及び3位に炭素数が18以上の脂肪酸が結合した消化吸収性の良いトリグリセリドが開示されている。また、2-モノグリセリドが人の生体に最も吸収され易い形態であると考えられていることから、特公平5-87497には、2位に生理機能を有する $\omega$ 3又は $\omega$ 6系高度不飽和脂肪酸を結合させ、1及び3位に消化管の酵素により容易に加水分解される飽和脂肪酸を結合させたトリグリセリドが開示されている。

【0004】一方、脂肪酸の生理機能に目を向けると、近年、アラキドン酸及びドコサヘキサエン酸が注目されている。これら脂肪酸は、母乳中に含まれており、乳児の発育に役立つとの報告（「Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research」, Elsevier Science Publishers, 1993, pp.261-264）や、胎児の身長や脳の発育に重要であるとの報告（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1073-1077 (1993), Lancet, 344, 1319-1322 (1994)）がある。

【0005】そして、いくつかの公的機関から推奨摂取量が公表され（未熟児：アラキドン酸60、ドコサヘキサエン酸40；正常児：アラキドン酸20、ドコサヘキサエン酸20mg/kg体重/日（WHO-FAO (1994)）、ヨーロッパの数カ国では既にドコサヘキサエン酸と併せて酸酵生産したアラキドン酸をトリグリセリドとして配合した未熟児用調製乳が市販されている。しかし、調製乳に加えたトリグリセリドのアラキドン酸及び／又はドコサヘキサエン酸の結合位置に関しては考慮されていない。

【0006】人の母乳中のトリグリセリド構造は、トリグリセリドの2位にパルミチン酸（16:0）が結合する割合が高く、1及び3位に高度不飽和脂肪酸あるいは中鎖脂肪酸が結合する割合が高いと考えられている（Christie, W.W., (1986) The Positional Distribution of Fatty Acids in Triglycerids, Analysis of Oils and Fats in (Hamilton, R.J., and Russell, J.B., eds.) pp. 313-339, Elsevier Applied Science, London）。

【0007】これに対し、前述の脂肪酸組成を母乳の組成に近付けるために調製乳に加えられる、酸酵法で生産されたアラキドン酸含有トリグリセリドの構造は、パルミチン酸が2位に結合し、1及び3位に高度不飽和脂肪酸が結合している構造脂質、つまり、トリグリセリドの2位に炭素数が16～18の飽和脂肪酸、1及び3位に高度不飽和脂肪酸又は中鎖脂肪酸が結合した、構造が明確に確認されている構造脂質の開発が強く望まれている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、ヒト母乳型のトリグリセリド構造と考えられている構造脂質、つまり、トリグリセリドの2位が炭素数が16～18の飽和脂肪酸であり、1及び3位に結合した不飽和脂肪酸の少なくともひとつが $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸である新規なトリグリセリド、もしくはトリグリセリドの2位が炭素数が16～18の飽和脂肪酸であり、1及び3位の一方が炭素数が4～18の飽和脂肪酸であり、もう一方が $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸である新規なトリグリセリドの製造方法を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】1, 3位特異的リパーゼを用いたエステル交換反応によってトリグリセリドの2位に炭素数8～14の脂肪酸が結合し、1及び3位に炭素数が18以上の脂肪酸が結合したトリグリセリドを製造する方法は、前述の特公平4-12920に開示されている。しかし2位の脂肪酸が炭素数がさらに増加した炭素数16～18の飽和脂肪酸からなるトリグリセリドを原料とし、1, 3位特異的リパーゼを用い、 $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系の不飽和脂肪酸とのエステル交換反応を行なうには、反応温度を50℃以上にしなければならない。該反応は、固定化酵素を用いた反応であり、2位に炭素数が16～18の飽和脂肪酸が結合し、1, 3位に $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び／又は $\omega$ 9系の不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを製造するには、反応温度が高くなると酵素の寿命が短くなることに加え、高度不飽和脂肪酸が変性する危険性を含んでいる。

【0010】そこで、本発明者等は上記の課題を解決するために鋭意研究した結果、2位に炭素数が16～18の飽和脂肪酸が結合しているグリセリドに、1, 3位のエステル結合に特異的に作用するリパーゼを作用させ、エステル交換反応によって1及び3位の少なくとも一方の脂肪酸が $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び／又は $\omega$ 9系の不飽和脂肪酸となったトリグリセリドを製造するに際し、一旦、トリグリセリドの2位の脂肪酸が炭素数が16～18の飽和脂肪酸であり、1及び3位の脂肪酸が中鎖脂肪酸である融点が45℃以下のトリグリセリドを原料として用いることが好ましいことを明かした。以下、本発明の要旨を要約する。

及び3位の少なくとも一方に $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び/又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを、2位に炭素数が16～18の飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドを基質として用い、 $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び/又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸又はそのエステルが存在下で、1、3位に特異的に作用するリパーゼによるエステル交換反応によって製造することができる。

【0012】2位に炭素数が16～18の飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドとしては、例えば、トリパルミチン（1、2及び3位の全てがパルミチン酸（16:0））、トリストアリン（1、2及び3位の全てがステアリン酸（18:0））を挙げることができるが、トリグリセリドの構成飽和脂肪酸の炭素数が16以上の場合は、これに1、3位特異的リパーゼと $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸とを、有機溶媒を含まない反応系中で、50℃以下で反応させたとき、1、3位でのエステル交換反応はほとんど進まず、目的とする構造を持ったトリグリセリドは得られない。

【0013】これは、リパーゼが液体状の油脂には作用するが、固体状の油脂にはほとんど作用しないという性質に起因している。したがって、トリグリセリドの構成飽和脂肪酸の炭素数が多くなると融点が高くなる分、これに応じて反応温度を高くする必要がある。例えば、トリパルミチンを使用する場合には、反応液組成によって異なるが反応は50～70℃で行わなければならない。このため、酵素の失活とエステル交換のために添加した不飽和脂肪酸の変性が問題となる。

【0014】そこで、これら融点の高いトリグリセリドを基質原料として用いるときには、エステル交換で1及び3位の脂肪酸を目的とする不飽和脂肪酸に交換する前に、例えば、原料トリグリセリドの1及び/又は3位に結合している脂肪酸をカプリル酸のような炭素数8～12程度の中鎖脂肪酸又はオレイン酸、リノール酸などの融点の低い脂肪酸にエステル交換し、融点を45℃以下に低下させたトリグリセリドを原料として使用すると良いことを明らかにした。

【0015】また、この方法では、一旦1位または3位に結合した高度不飽和脂肪酸は、その後さらに1、3位特異的リパーゼを作用させてもエステル交換を起こしにくく、中鎖脂肪酸が優先的にエステル交換されるため、反応を繰り返すことによって、目的の2位に炭素数が16～18の飽和脂肪酸が結合し、1及び/又は3位に $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び/又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの収量を増加させることができることも明らかにした。

【0016】本発明の特徴を明確にするために、トリグリセリドに結合した脂肪酸がすべて同じで炭素数16～18の飽和脂肪酸である場合を例に説明したが、トリグリセリドにエステル結合する脂肪酸はすべて同じである必要はなく、トリグリセリドの2位に炭素数16～18

の飽和脂肪酸が結合していれば、1及び3位には炭素数4～18のいかなる脂肪酸が結合していてもまたいかなる組み合わせでも良く、45℃以下で反応を行うことのできるトリグリセリドを基質として用いることは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0017】また、2位に飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドとは、本発明の目的からして2位に炭素数16～18の飽和脂肪酸が結合していれば、1及び3位のいずれかに、 $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸が結合していても構わず、これらの基質を用いた場合は不飽和脂肪酸の結合していない位置に $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸をエステル交換にて導入することができ、1及び3位に結合している $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び/又は $\omega$ 9系の不飽和脂肪酸の含量を高めることができる。

【0018】たとえば、2位が飽和脂肪酸で1及び3位のいずれかに不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドとして、クリプトコデニウム（*Cryptocodenum*）属、スラウストキトリウム（*Thraustochytrium*）属、シゾキトリウム（*Schizochytrium*）属、ウルケニア（*Ulkenia*）属、ジャポノキトリウム（*Japonochytrium*）属又はハリフォトリス（*Haliphthoros*）属の微生物を培養して得られた油脂が利用できる。

【0019】これらからは、例えば1、2-ジパルミトイル-3-ドコサヘキサノイルトリグリセリドを単離することができ、このトリグリセリドを基質に1、3位特異的リパーゼを作用させ、 $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸もしくはその脂肪酸エステルとエステル交換させると、前述のようにドコサヘキサエン酸はほとんどエステル交換されないため、1位のパルミチン酸のみがエステル交換される。不飽和脂肪酸としてアラキドン酸を用いた場合には、1及び3位の一方にドコサヘキサエン酸が結合し、他方にアラキドン酸が結合し、2位にパルミチン酸が結合したトリグリセリドが製造できる。

【0020】本発明には、トリグリセリドの1、3位特異的リパーゼを触媒として用いることができ、特に限定されるものではないが、例えば、リゾプス（*Rhizopus*）属、リゾムコール（*Rhizomucor*）属、ムコール（*Mucor*）属、ペニシリウム（*Penicillium*）属、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、フミコーラ（*Humicola*）属、フザリウム（*Fusarium*）属などの微生物が生産するリパーゼ、ブタ膵臓リパーゼなどが挙げられる。かかるリパーゼについては、市販のものを用いることができる。

【0021】例えば、リゾプス・デレマー（*Rhizopus delemar*）のリパーゼ（田辺製薬（株）製；タリパーゼ）、リゾムコール・ミイハイ（*Rhizomucor miehei*）のリパーゼ（ノボ・ノルディスク（株）製；リボザイムIM）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）のリパーゼ（天野製薬（株）製；リパーゼA）、フミコーラ・ランギノーサ（*Humicola lanuginosa*）のリパーゼ（ノボ・ノルディスク（株）製；リボラーゼ）、ムコ

10

20

30

40

50

ール・ジャバニカス (*Mucor javanicus*) のリパーゼ (天野製薬 (株) 製; リパーゼM)、フザリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*) のリパーゼ等が挙げられる。これらのリパーゼの使用形態はそのままでも良く、また、セライトやイオン交換樹脂、セラミックス担体などに固定化したリパーゼを用いてもよい。

【0022】本反応系に加える水分量は極めて重要で、水をまったく含まない場合はエステル交換が進行せず、また、水分量が多い場合は加水分解が起こり、トリグリセリドの回収率が低下したり、生成した部分グリセリドでは自発的なアシル基転移が起こり、2位の飽和脂肪酸が1位あるいは3位に転移する。従って、結合水を持たない固定化酵素を用いたとき、主反応を行う前に、ま

ず、水を添加した基質を用いて酵素を活性化し、主反応では水を添加していない基質を用いると効果的である。バッチ反応で活性化するには、加えた酵素量の0~1、000% (重量%) の水を含む基質を用いて酵素を前処理し、またカラム法で活性化するには、水飽和の基質を連続的に流すとよい。

【0023】例えば、セライト又はセラミックス担体に固定化したリゾプス・デレマー (*Rhizopus delenar*) のリパーゼ (田辺製薬 (株) 製; タリパーゼ) を用いてバッチ反応で活性化する時の水分量は、加えた酵素量の10~200% (重量%) である。しかし、エステル交換反応の活性化に必要な水分量は用いる酵素の種類により大きく左右され、例えば、リゾムコール・ミイハイ (*Rhizomucor miehei*) のリパーゼ (ノボ・ノルディスク (株) 製; リボザイムM) であれば、ほとんど水分を必要とせず、むしろ過剰の水を除去しなければならない。

過剰水の除去は主反応を妨害しないトリグリセリドを基質として選択し、これを固定化酵素で加水分解するとよい。

【0024】バッチ反応におけるリパーゼの使用量は反応条件によって適宜決定すれば良く、特に制限されるものではないが、例えばセライトやセラミックス担体に固定化したリゾプス・デレマー (*Rhizopus delenar*) のリパーゼ、あるいはリゾムコール・ミイハイ (*Rhizomucor miehei*) のリパーゼを用いたときには、反応混液の1~30% (重量%) が適量である。

【0025】バッチ反応におけるエステル交換反応は、以下の方法により行う。すなわち、2位に炭素数が16~18の飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドに、 $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸あるいはその脂肪酸エステルを加える。脂肪酸エステルとしては、例えばメチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステルなどを用いることができる。原料として用いるトリグリセリド/脂肪酸またはトリグリセリド/脂肪酸エステル比は1:0.5~20が適量である。この基質に適当な量 (通常5.000~50.000U/g; こ

こでリパーゼ1Uとは、オリーブ油を基質として用い、1分間に1 $\mu$ molの脂肪酸を遊離させる酵素量である) の活性化または脱水した1、3位特異的リパーゼを加え、攪拌または振盪しながら45℃以下、好ましくは30℃付近で2~100時間エステル交換反応を行えばよい。

【0026】上記固定化酵素は繰り返し使用することができる。すなわち、反応後固定化酵素だけを反応器内に残し、反応液を新たに調製した基質と交換することにより反応を継続することができる。また、カラム法によるエステル交換反応は、酵素1g当り、0.05~20ml/hrで基質を連続的に流すとよい。また、エステル交換反応を繰り返して行うことにより、目的のトリグリセリド含量を高めることができる。すなわち、 $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸もしくはその脂肪酸エステルの存在下に、トリグリセリドの1、3位特異的リパーゼを作用させて、1及び3位の脂肪酸が $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び/又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸にエステル交換された反応液を得る。

【0027】次に、該反応溶液から後述する方法によりトリグリセリドを精製し、該精製トリグリセリドを原料として再度 $\omega$ 3、 $\omega$ 6又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸またはその脂肪酸エステルでエステル交換反応を行う。この繰り返しエステル化反応により目的のトリグリセリド含有量を飛躍的に高めることができ、繰り返し回数は2~5回が好ましい。

【0028】従来の固定化リパーゼを用いたエステル交換反応では、副反応として起こる加水分解反応により生成した部分グリセリドの2位に結合していた脂肪酸のアシル基転移が誘発された。しかし、本発明では、加水分解反応をほぼ完全に抑えることができ、部分グリセリドの生成量は1%程度であり、従来の問題点を解決することができた。また、基質に含まれている水分含量が数千ppm以下であれば、副反応として起こる加水分解を無視することができ、基質中に含まれる水分量を精密制御する必要がないという特徴を有している。

【0029】さらに、従来の固定化酵素を用いた有機溶媒中での反応あるいは50℃以上の反応では数回の使用で酵素活性が低下したのに対して、本発明では有機溶媒を用いない反応系で45℃以下で反応を行うため酵素の失活が起こらず、バッチ反応で数十回以上、カラム反応で100日以上連続して酵素を使用することも可能である。

【0030】本発明では、基質が単純であるために、反応により得られたトリグリセリドは数種の分子種から構成される。そこで、液体クロマトグラフィー、分子蒸留、流下膜蒸留、精密蒸留などの常法あるいはその組み合わせにより、目的のトリグリセリドを容易に単離することができる。本発明で製造する反応後のトリグリセリドは、1位及び/又は3位に不飽和脂肪酸が結合したト

リグリセリドであり、該トリグリセリド、未反応原料、未反応の不飽和脂肪酸または脂肪酸エステル及びエステル交換されて生じた原料のトリグリセリドの1及び/又は3位に結合していた脂肪酸または該脂肪酸エステルとの混合物として存在している。

【0031】そこで、目的の1位及び/又は3位に不飽和脂肪酸が結合し、2位に炭素数が16～18の不飽和脂肪酸が結合したトリグリセリドの精製は、アルカリ脱酸、水蒸気蒸留、分子蒸留、減圧膜蒸留、真空精密蒸留、カラムクロマトグラフィー、溶剤抽出、膜分離のいずれか又はこれらを組み合わせることにより、上記のエステル交換された脂肪酸及び未反応の不飽和脂肪酸を除去することによって行うことができる。

【0032】本発明で得られるトリグリセリドの1及び3位を構成する脂肪酸は $\omega$ 3、 $\omega$ 6及び/又は $\omega$ 9系不飽和脂肪酸からなる。具体的には、 $\omega$ 3系不飽和脂肪酸としては、9, 12, 15-オクタデカトリエン酸( $\alpha$ -リノレン酸) [18:3, $\omega$ 3]、6, 9, 12, 15-オクタデカテトラエン酸(ステアリドン酸) [18:4, $\omega$ 3]、11, 14, 17-エイコサトリエン酸(ジホモ- $\alpha$ -リノレン酸) [20:3, $\omega$ 3]、8, 11, 14, 17-エイコサテトラエン酸 [20:4, $\omega$ 3]、5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸 [20:5, $\omega$ 3]、7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸 [22:5, $\omega$ 3]、4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸 [22:6, $\omega$ 3]を挙げることができる。

【0033】また、 $\omega$ 6系不飽和脂肪酸としては、9, 12-オクタデカジエン酸(リノール酸) [18:2, $\omega$ 6]、6, 9, 12-オクタデカトリエン酸( $\gamma$ -リノレン酸) [18:3, $\omega$ 6]、8, 11, 14-エイコサトリエン酸(ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸) [20:3, $\omega$ 6]、5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸(アラキドン酸) [20:4, $\omega$ 6]、7, 10, 13, 16-ドコサテトラエン酸 [22:4, $\omega$ 6]、4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサペンタエン酸 [22:5, $\omega$ 6]を挙げることができる。さらに、 $\omega$ 9系不飽和脂肪酸としては、6, 9-オクタデカジエン酸 [18:2, $\omega$ 9]、8, 11-エイコサジエン酸 [20:2, $\omega$ 9]、5, 8, 11-エイコサトリエン酸(ミード酸) [20:3, $\omega$ 9]を挙げることができる。さらに、アシル基はヒドロキシ化、エポキシ化、又はヒドロキシエポキシ化されたアシル基であっても構わない。本発明の新規なトリグリセリドの2位を構成する脂肪酸は、炭素数16～18の脂肪酸からなる。例えば、パルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)を挙げることができる。

【0034】

【実施例】次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。なお、本実施例では、便宜的に脂肪酸およびトリグリセリドを次のような略号で示す。まず、脂肪酸を表わす一文字略号には次のものを用いる。8:カプリル酸、P:パルミチン酸、A:アラキドン酸、M:ミード酸、D:ドコサヘキサエン酸。次に、トリグリセリ

ドを、1位に結合している脂肪酸を表わす一文字略号、2位に結合している脂肪酸を表わす一文字略号、3位に結合している脂肪酸を表わす一文字略号により三文字で表記する。従って、トリグリセリドの構造は例えば次の例のように表記される。例:8P8(1位にカプリル酸、2位にパルミチン酸、3位にカプリル酸が結合したトリグリセリド)

【0035】**実施例1**、トリパルミチン(PPP)とカプリル酸の1:2(wt/wt)混液を基質原料として使用し、基質混液10.5gと固定化リゾムコール・ミイハイ(Rhizomucor miehei)リパーゼ(ノボ・ノルディスク(株)製;リボザイムIM50)1.2gからなる反応液をねじ蓋付きバイアル瓶に入れ、50℃で48時間振盪(140回/分)しながらインキュベートした。反応後、固定化酵素だけを残して反応液を新しい基質混液と交換し、同じ条件下で反応を行った。固定化酵素を繰り返し使用しながら4回反応を行い、それぞれの反応液を回収した。

【0036】各反応液(10.5g)に70mlの0.5N KOH 溶液(20% エタノール溶液)を加え、100mlのヘキサンでグリセリド画分を抽出後、エバポレーターにより溶剤を除去してグリセリドを回収した。イヤトロスキャン(ヤترون(株)社製)でグリセリド組成を調べた結果、1回目のグリセリド中には8%のジグリセリドが含まれていたが、2回目以降のグリセリド中の部分グリセリド含量は1%以下であった。2～4回目のグリセリド画分の脂肪酸組成(モル%)はカプリル酸45.1%、パルミチン酸54.9%であった。

【0037】カプリル酸の交換率を高めるため、2～4回目のグリセリド画分を原料として再度エステル交換した。上記の反応に使用したリボザイム IM50(1.2g)に、調製したグリセリド3.5gとカプリル酸7gを加え、30℃で48時間振盪しながら反応を行った(5回目)。反応後、反応液を新しい基質と交換して同じ条件下で反応を行った(6回目)。5、6回目の反応液からグリセリド画分をヘキサン抽出により回収した(合計4.8g)。得られたグリセリドの脂肪酸組成(モル%)はカプリル酸64.2%、パルミチン酸35.8%であった。このグリセリド中に含まれる部分グリセリドは1%以下であり、アセトン/アセトニトリル(1:1, vol/vol)を溶出溶媒としてODSカラム(Wakosil-II 3C18, 4.6 x 150mm, 2本)で分析した結果、8P8の純度は93%であった。

【0038】得られた8P8(3.5g)とアラキドン酸(純度90%)7gを原料とし、上記の反応に用いたリボザイム IM50で30℃で48時間エステル交換反応を行い(7回目)、反応後の反応液をアルカリ条件下でヘキサン抽出し、グリセリド画分(4.8g)を得た。グリセリドの脂肪酸組成を分析したところ、カプリル酸、パルミチン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸はそ

れぞれ38.5、23.1、2.4及び34.0モル%であった。このグリセリドをアセトン/アセトニトリル(1:1, vol/vol)を溶出溶媒としてODSカラム(SH-345-5, 20 x 500mm YMC(株)製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにより分画した結果、8PAとAPAがそれぞれ0.72、0.44g得られた。

【0039】実施例2. 実施例1に記載した方法の100倍の規模で反応を行って8P8を調製し、原料として使用した。リゾプス・デレマー(*Rhizopus delemar*)のリパーゼ(田辺製薬(株)製;タリパーゼ)をJ. Ferment. Bioeng., 81, 299-303 (1996)に従ってセラミックス担体 SM-10(日本ガイシ(株)製)に固定化した。固定化酵素10g(31,000U/g)をカラムに充填した後、水飽和の大豆油:カプリル酸1:2(wt/wt)混合液を30℃、流速3ml/hrで100ml洗い固定化酵素を活性化した。

【0040】次いで水を加えていない大豆油50mlを流して過剰水を除去した後、8P8とアラキドン酸エチルエステル(純度90%)の1:4(wt/wt)混液を同じ条件で流しながらエステル交換反応を行った。反応液100gを高真空下で蒸留してグリセリド画分を残渣として回収した後、実施例1に従ってアルカリ条件下でヘキサン抽出した。エバポレーターにより溶媒を除去し、ヘキサン抽出物35.7gを得た。このヘキサン抽出物に含まれているトリグリセリドと脂肪酸エステルの組成比をイヤトロスキャンで分析したところ91:9であった。また、脂肪酸組成を分析した結果、カプリル酸、パルミチン酸、γ-リノレン酸、ジホモ-γ-リノレン酸及びアラキドン酸は、それぞれ24.4、34.5、1.5、2.6及び37.0モル%であった。

【0041】実施例3. 実施例1で用いた固定化リゾムコール・ミイハイ(*Rhizomucor miehei*)リパーゼ(ノボ・ノルディスク(株)製;リボザイムIM60)に含まれている過剰の水を除去するために、該固定化酵素12g、SUNTGA-25(サントリー(株)製)60gからなる反応混液を100mlのねじ蓋付きバイアル瓶に入れ、30℃で48時間振盪しながら反応させた(1回目)。固定化酵素だけを反応器に残し、実施例2で作成した8P8(12g)とミード酸エチルエステル(純度90%)48gを加えて十分窒素置換した後、30℃で72時間振盪しながらエステル交換反応を行った(2、3回目)。

【0042】反応後、2回目と3回目の反応混液を合わせ、そのうち100gを実施例2と同様に、高真空下で蒸留してグリセリド画分を残渣として回収した。次いで、実施例1に従ってアルカリ条件下でヘキサン抽出し

た後、エバポレーターによりヘキサンを除去し、24.1gのグリセリド画分を得た。この中に含まれているトリグリセリドと脂肪酸エステルの組成比をイヤトロスキャンで分析したところ92:8であった。実施例1に従って高速液体クロマトグラフィーを行い示差屈折計のピーク面積から脂肪酸エステルと各トリグリセリド成分を定量したところ、MPMは12.0%であった。またこの画分の脂肪酸組成は、カプリル酸、パルミチン酸及びミード酸がそれぞれ31.2、35.7及び33.1モル%であった。

【0043】エステル交換率を高めるために、得られたエステル交換トリグリセリドを再度ミード酸エチルエステルでエステル交換した。上記の固定化酵素にエステル交換トリグリセリド12gとミード酸エチルエステル48gを加えて30℃で72時間振盪しながら反応を行った(4回目)。反応後、反応液55gを上述した方法で蒸留し、12.3gのグリセリド画分を得た。この画分の脂肪酸組成は、カプリル酸、パルミチン酸及びミード酸がそれぞれ5.2、38.6及び56.1モル%であった。

【0044】実施例4. 実施例1で用いた固定化リゾムコール・ミイハイ(*Rhizomucor miehei*)リパーゼ(ノボ・ノルディスク(株)製;リボザイムIM60)に含まれている過剰の水を除去するために、該固定化酵素2g、SUNTGA-25(サントリー(株)製)10gからなる反応混液を20mlのねじ蓋付きバイアル瓶に入れ、30℃で48時間振盪しながら反応させた(1回目)。固定化酵素だけを反応器に残し、実施例2で作成した8P8(12g)とSUNTGA-25を加水分解して得られた脂肪酸混液8gを加えて十分窒素置換した後、30℃で48時間振盪しながらエステル交換反応を行った(2~5回目)。反応後、2~5回目の反応混液からヘキサン抽出したグリセリドを合わせ、再度のエステル交換反応の基質とした。

【0045】上記の固定化酵素の入った反応器にエステル交換トリグリセリド2gとSUNTGA-25由来の脂肪酸混液10gを加え、30℃で48時間振盪しながら反応させた(6、7回目)。6、7回目の反応混液からグリセリド画分を抽出し、再々度のエステル交換反応の基質とし、同様に反応を行った(8回目)。エステル交換反応を3回繰り返すことにより得られたトリグリセリドを構成する脂肪酸組成、トリグリセリドの1、3位および2位の各脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。この結果を表1に示す。

【0046】

【表1】

10

20

30

40

表1 (単位:モル%)

脂肪酸の種類	新規構造脂質		
	全体	1, 3位	2位
8:0	9	9	2
16:0	34	6	96
18:1 (n-7)	11	15	0
18:2 (n-6)	15	22	1
18:3 (n-6)	2	3	1
20:3 (n-6)	1	3	0
20:4 (n-6)	15	23	0

【0047】比較例1. 実施例2で作成した8P8と固定化酵素をそれぞれ原料および触媒として使用した。固定化酵素2g、大豆油4g、カプリル酸8gおよび水0.5gを20mlのバイアル瓶に入れ、30℃で24時間振盪しながらインキュベートすることにより固定化酵素を活性化した。活性化した酵素を反応器内に残し、これに水を含まない基質、アラキドン酸/8P8 (4:1, wt/wt) あるいは、アラキドン酸/PPP (4:1, wt/wt) を加え、前者の反応は30℃で後者の反応は50℃で振盪しながら行った。また反応は24時間毎に反応液を新しい基質と交換しながら繰り返し固定化\*

\* 酵素の安定性を比較した。

【0048】基質にPPPを用いて50℃で反応を繰り返したとき固定化酵素を7回使用した後ではアラキドン酸の取り込み量は最初の取り込み量の10%以下に低下した(1回目と7回目のアラキドン酸の取り込み量はそれぞれ47%と3%)。一方、基質に8P8を用いて30℃で反応を繰り返したとき固定化酵素を50回使用してもアラキドン酸の取り込み量はほとんど変わらなかった(1回目と50回目のアラキドン酸の取り込み量はそれぞれ41%と38%)。

フロントページの続き

(72)発明者 藤川 茂昭  
大阪府三島郡島本町山崎5-2-5 サン  
トリー株式会社技術開発センター内  
(72)発明者 島田 裕司  
大阪府堺市柳屋町東4-2-31

(72)発明者 杉原 耿雄  
兵庫県伊丹市千僧6-87  
(72)発明者 富永 嘉男  
大阪府大阪市西淀川区歌島2-7-2  
Fターム(参考) 4B064 AD85 CA21 CB30 CD07 CD22  
4H006 AA02 BT12 KA02  
4H059 BA33 BB05 CA35 EA17 EA40

【公報種別】 特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】 第 1 部門第 1 区分

【発行日】 平成 17 年 10 月 20 日 (2005.10.20)

【公開番号】 特開 2000-4894 (P2000-4894A)

【公開日】 平成 12 年 1 月 11 日 (2000.1.11)

【出願番号】 特願平 10-172942

【国際特許分類第 7 版】

C 1 2 P 7/64

C 0 7 C 69/30

C 1 1 C 3/08

C 1 1 C 3/10

【F I】

C 1 2 P 7/64

C 0 7 C 69/30

C 1 1 C 3/08

C 1 1 C 3/10

【手続補正書】

【提出日】 平成 17 年 6 月 17 日 (2005.6.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 3 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 0 3 3】

また、 $\omega$  6 系不飽和脂肪酸としては、9, 12-オクタデカジエン酸（リノール酸）[18: 2,  $\omega$  6]、6, 9, 12-オクタデカトリエン酸（ $\gamma$ -リノレン酸）[18: 3,  $\omega$  6]、8, 11, 14-エイコサトリエン酸（ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸）[20: 3,  $\omega$  6]、5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸（アラキドン酸）[20: 4,  $\omega$  6]、7, 10, 13, 16-ドコサテトラエン酸 [22: 4,  $\omega$  6]、4, 7, 10, 13, 16, -ドコサペンタエン酸 [22: 5,  $\omega$  6] を挙げることができる。さらに、 $\omega$  9 系不飽和脂肪酸としては、6, 9-オクタデカジエン酸 [18: 2,  $\omega$  9]、8, 11-エイコサジエン酸 [20: 2,  $\omega$  9]、5, 8, 11-エイコサトリエン酸（ミード酸）[20: 3,  $\omega$  9] を挙げることができる。さらに、アシル基はヒドロキシ化、エポキシ化、又はヒドロキシエポキシ化されたアシル基であっても構わない。

本発明の新規なトリグリセリドの 2 位を構成する脂肪酸は、炭素数 16 ~ 18 の脂肪酸からなる。例えば、パルミチン酸 (16: 0)、ステアリン酸 (18: 0) を挙げることができる。